

## LES HEMOGLOBINES DES AMPHIBIENS: SEPARATION ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES CHAINES D'UNE HEMOGLOBINE DU CRAPAUD BUFO BUFO

J. P. CAFFIN, J. P. CHAUVET et R. ACHER

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences de Paris, France*

Reçu le 30 septembre 1969

A toad (*Bufo bufo*) hemoglobin has been purified and two types of chain have been separated by counter-current distribution. The  $\alpha$ -chain has a N-terminal sequence Ac-Ala-Leu and a C-terminal sequence Tyr-Arg. The  $\beta$ -chain has a N-terminal sequence Val-His-Leu and a C-terminal sequence Tyr-His.

### 1. Introduction

Les amphibiens présentent un intérêt tout particulier au point de vue de l'évolution car ils font la transition entre les poissons et les vertébrés tétrapodes. On peut penser que ce caractère de classe intermédiaire se traduit sur le plan moléculaire et se reflète dans la structure des protéines. Les hémoglobines forment une famille de protéines abondantes et faciles à préparer dont l'étude est assez avancée en ce qui concerne les mammifères mais qui, par contre, ne fait que débiter dans le cas des vertébrés inférieurs [1]. Chez les amphibiens anoures la séparation et la caractérisation préliminaire des chaînes des hémoglobines des grenouilles *Rana esculenta* [2, 3], *Rana ridibunda* [4] et *Rana catesbeiana* [5] ont été réalisées mais la plupart des travaux ont jusqu'à présent été effectués sur des hémoglobines non dissociées [6, 7]. Une espèce de la famille des Bufonidés, le crapaud *Bufo bufo* a été examinée de façon à pouvoir faire la comparaison avec les hémoglobines des espèces du genre *Rana*.

### 2. Purification de l'hémoglobine

Les crapauds utilisés forment un lot relativement homogène puisqu'ils proviennent de la même région

(Sarthe) et ont été ramassés à la même époque (printemps 1966). Après décapitation des animaux, le sang est recueilli dans une solution de citrate trisodique à une concentration calculée de façon à ce que le titre final soit d'environ 0,8%. Les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation (16.000 g, 4°C), puis lavés à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 0,9%, et enfin lysés par addition au culot de 2 volumes d'eau et de 0,5 volume de toluène. Après une agitation de 15 h en chambre froide, la phase aqueuse qui contient l'hémoglobine est séparée par centrifugation. L'hémoglobine est alors purifiée par précipitation fractionnée au moyen

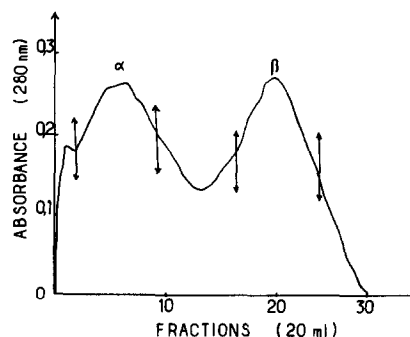


Fig. 1. Distribution à contre-courant de la globine du crapaud *Bufo bufo*. (Détails dans le texte).

Tableau 1  
Séquences terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des hémoglobines du crapaud *Bufo bufo* et de la grenouille *Rana esculenta*.

	Chaîne $\alpha$		Chaîne $\beta$	
	N-term.	C-term.	N-term.	C-term.
<i>Bufo bufo</i>	Ac-Ala-Leu	Tyr-Arg	Val-His-Leu	Tyr-His
<i>Rana esculenta</i>	Ac-Ala-Leu	Lys-Tyr	Gly	Ala-Tyr-His

de sulfate d'ammonium (fraction précipitée entre 0,50 et 0,75 de saturation) puis par chromatographie sur carboxyméthyl-Sephadex à pH 6 dans les conditions décrites pour la préparation de l'hémoglobine de la grenouille *R. esculenta* [2]. Le matériel ainsi obtenue paraît homogène au cours de l'électrophorèse sur gel d'amidon à pH 8,5 dans des tampons Tris ou Veronal.

### 3. Separation des chaînes

Après élimination de l'hème en milieu acide, la séparation des chaînes a été réalisée sur la globine soumise à une réduction par le  $\beta$ -mercaptoéthanol à pH 8,5 en présence d'urée 8 M (réf. [2]). La globine est précipitée en ajoutant 15 volumes d'acétone à la solution, et le précipité, lavé deux fois avec de l'acétone, puis une fois avec de l'éther, est repris dans un petit volume d'eau et lyophilisé.

La globine réduite est alors soumise à une distribution à contre-courant dans un système constitué de butanol secondaire - acide acétique 0,5 M - acide dichloracétique 8%, dans un rapport de 9 : 10 : 1 (v/v/v), la phase aqueuse servant de phase stationnaire, et la phase organique de phase mobile - 100 mg de globine dont dissous dans 20 ml de phase aqueuse et répartis dans les deux premiers tubes d'un appareil manuel Post, les volumes des phases étant de 10 ml. Après 30 transferts, les deux phases de chaque tube sont homogénéisées par addition de 1 ml d'alcool méthylique et la teneur en protéine est déterminée dans chaque tube par l'absorption à 280 nm. Deux constituants sont ainsi nettement séparés: la fraction A (tubes 2 à 10) pèse 33 mg, la fraction B (tubes 17 à 24) pèse 32 mg, la récupération totale en matériel étant d'environ 80% (fig. 1).

Les chaînes A et B ont été soumises à l'analyse en acides aminés [8] et à l'hydrolyse trypsique de façon à réaliser des cartes chromatoelectrophorétiques de

peptides [9]. Les deux chaînes se distinguent nettement l'une de l'autre. Les extrémités N et C-terminales de chaque chaîne ont été déterminées.

### 4. Caractérisation préliminaire des chaînes

Les extrémités N-terminales ont été étudiées à l'aide de la méthode du dinitrofluorobenzène de Sanger et de la technique au phénylisothiocyanate d'Edman dans les conditions antérieurement précisées [10, 11]. Les extrémités C-terminales ont été déterminées en utilisant les carboxypeptidases A et B et l'hydrazinolyse [12].

#### 4.1. Chaîne $\alpha$

Une des deux chaînes ne possède aucun acide aminé N-terminal révélaible par les réactifs de Sanger et d'Edman et l'existence d'une extrémité N-acétylée, semblable à celle qui a été mise en évidence dans l'hémoglobine des grenouilles *Rana catesbeiana* [13] et *Rana esculenta* [3] a été alors envisagée. La chaîne  $\alpha$  a été soumise à l'action de la pepsine (Rapport pondéral enzyme/substrat 4%, 24 h, milieu HCl 0.01 M, 25°) et l'éventuel peptide ou amino acide N-acétylé a été recherché dans la fraction non adsorbée sur le Dowex 50-X<sub>2</sub> (H<sup>+</sup>) dans les conditions antérieurement décrites [3]. Le matériel non adsorbé est soumis à une chromatographie descendante dans le système alcool isoamylique - pyridine - eau (30 : 30 : 35 v/v/v) et la révélation est réalisée à l'aide du réactif de Rydon et Smyth [14]. Un dipeptide contenant Ala et Leu est ainsi mis en évidence. La carboxypeptidase A attaque ce peptide en libérant 0,91 eq. de leucine et donne un composé qui ne réagit pas à la ninhydrine et qui fournit de l'alanine après hydrolyse acide. L'hydrazinolyse du peptide réalisée comme décrit précédemment [3] permet d'identifier l'acétylhydrazide. D'autre part le dipeptide intact possède un com-

portement chromatographique et électrophorétique identique à celui de l'acetyl-alanyl-leucine synthétique.

La recherche des extrémités C-terminales effectuée par hydrazinolyse [12] sur la globine permet d'identifier l'ornithine et l'histidine par chromatographie bidimensionnelle sur plaques de gel de silice; ceci semble indiquer que l'une des chaînes possède un résidu C-terminal d'arginine qui se dégrade en ornithine. La carboxypeptidase B agissant sur la chaîne précédente (rapport enzyme/substrat 2%; 38°; pH 8; 60 mn) libère de l'arginine et de la tyrosine dans un rapport 1 : 0,91 ainsi que d'autres acides aminés en proportions plus faibles. L'enchaînement C-terminal est donc Tyr - Arg. La chaîne étudiée peut donc être rangée dans la série  $\alpha$  car elle possède une extrémité N-terminale Ac - Ala - Leu comme la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine de grenouille *R. esculenta* et une extrémité C-terminale Tyr - Arg comme la plupart des chaînes  $\alpha$  des hémoglobines de vertébrés.

#### 4.2. Chaîne $\beta$

La technique de Sanger fournit 0,9 eq. de DNP-Val par chaîne. La technique d'Edman permet de déterminer l'enchaînement Val - His - Leu.

L'hydrazinolyse effectuée sur la globine a indiqué que l'une des chaînes possède à son extrémité C-terminale un résidu d'histidine. La carboxypeptidase A attaque la chaîne précédente (rapport enzyme/substrat 2%; 38°; pH 8; 45 mn) en libérant de l'histidine et de la tyrosine dans le rapport 1 : 0,97 ainsi que d'autres acides aminés en proportions plus faibles. L'enchaînement C-terminal est donc Tyr-His.

Le tableau 1 récapitule les résultats.

L'hémoglobine du crapaud *Bufo bufo* rappelle

donc celle de la grenouille *R. esculenta* par sa chaîne  $\alpha$  qui possède une séquence N-terminale Ac - Ala - Leu. Par contre sa chaîne  $\beta$  se distingue de celle de l'hémoglobine de la grenouille car le résidu N-terminal est Val et non Gly et cette chaîne rappellerait, par ses extrémités, la chaîne  $\beta$  des hémoglobines de mammifères.

#### Références

- [1] M.O.Dayhoff and R.V.Eck (eds.), Atlas of Protein Sequence and Structure 1967-1968 (National Bio-medical Research Foundation, Silver Spring).
- [2] J.P.Chauvet et R.Acher, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 265 (1967) 2084.
- [3] J.P.Chauvet et R.Acher, FEBS Letters 1 (1968) 305.
- [4] A.A.Christomanos, International Symposium on Comparative Hemoglobin Structure, Thessaloniki, 1966.
- [5] S.J.Agarwal et A.Riggs, J. Biol. Chem. 244 (1969) 2372.
- [6] L.Tentori, G.Vivaldi, S.Carta, A.M.Salvati, M.Sorcini and S.Velani, Arch. Biochem. Biophys. 109 (1965) 404.
- [7] L.Tentori, G.Vivaldi, S.Carta, S.Velani and R.Zito, Biochim. Biophys. Acta 133 (1967) 177.
- [8] D.H.Spackman, S.Moore and W.H.Stein, Anal. Chem. 30 (1958) 1190.
- [9] J.Chauvet, G.Nouvel et R.Acher, Biochim. Biophys. Acta 115 (1966) 130.
- [10] J.Chauvet, G.Nouvel et R.Acher, Biochim. Biophys. Acta 115 (1966) 121.
- [11] W.A.Schroeder, J.R.Shelton, J.B.Shelton, J.Cormick et R.T.Jones, Biochemistry 2 (1963) 992.
- [12] V.Braun and W.A.Schroeder, Arch. Biochem. Biophys. 118 (1967) 241.
- [13] W.De Witt et V.M.Ingram, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27 (1967) 236.
- [14] H.N.Rydon et P.N.G.Smyth, Nature 169 (1952) 922.